

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. August 2003 (28.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/070772 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C08B 31/00**,
A61K 31/718, 47/36

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/01716

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. Februar 2003 (20.02.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 07 072.5 20. Februar 2002 (20.02.2002) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS GMBH** [DE/DE]; Industriestrasse 1-3, 61191 Rosbach-Rodheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SOMMERMEYER, Klaus** [DE/DE]; In der Laubach 26, 61191 Rosbach v.d.H. (DE).

(74) Anwälte: **LUDERSCHMIDT, Wolfgang** usw.; John-F.-Kennedy-Strasse 4, 65189 Wiesbaden (DE).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

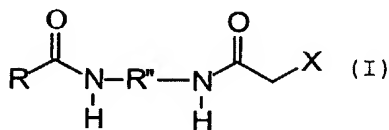
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: STARCH DERIVATIVES, STARCH ACTIVE SUBSTANCE CONJUGATES, METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF AND THEIR USE AS MEDICAMENTS

(54) Bezeichnung: STÄRKEDERIVATE, STÄRKE-WIRKSTOFF-KONJUGATE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL



(57) Abstract: The invention relates to starch derivatives of formula (I), in which: X represents a bromine or iodine atom; R" represents a straight-chain or branched alkyl group, aryl group or aralkyl group, and; R-CO- represents an oxidized substituted or unsubstituted starch radical that is oxidized on the reducing terminal group to form a carboxylic acid. Starch derivatives of formula (I) can selectively couple to active substances containing SH groups and have a prolonged half-life period in the human body.

The invention also relates to coupling products of compound (I) with active substances, to methods for the production thereof, and to their use as medicaments.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Stärkederivate der Formel (I), wobei X ein Brom oder Iodatombedeutet, R" eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Aryl- oder Aralkylgruppe bedeutet und R-CO- einen oxidierten substituierten oder unsubstituierten Stärkerest bedeutet, der an der reduzierenden Endgruppe zu einer Carbonsäure oxidiert ist. Stärkederivate der Formel (I) lassen sich selektiv an SH-Gruppen enthaltende Wirkstoffe koppeln und besitzen eine verlängerte Halbwertszeit im menschlichen Körper. Ausserdem betrifft die Erfindung Kopplungsprodukte der Verbindung (I) mit Wirkstoffen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Arzneimittel.



WO 03/070772 A1

Stärkederivate, Stärke-Wirkstoff-Konjugate, Verfahren
zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als
Arzneimittel

Die vorliegende Erfindung betrifft Stärkederivate, Konjugate aus solchen Stärkederivaten mit Wirkstoffen und ein Verfahren zu ihrer Herstellung. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der Stärke-Wirkstoff-Konjugate als Arzneimittel.

Die Konjugation von pharmazeutischen Wirkstoffen wie therapeutischen Proteinen, Antibiotika, Nukleinsäuren, Cytokinen oder Hormonen mit Polyethylenglycol-Derivaten ("Pegylierung") ist eine weit verbreitete Methode (Francis G. E. et al., Polyethylene glycol modification in tumor targeting and cytokine therapy., J. Drug Targeting (1995), 3: 321-340). Damit werden beispielsweise an sich wasserunlösliche Wirkstoffe in lösliche Derivate umgewandelt, die dann in die Blutbahn applizierbar sind.

Weiterhin ist es möglich, durch die Kopplung von Polyethylenglycol-Derivaten das Molekulargewicht von Wirkstoffen so zu erhöhen, dass die Filtration über die Niere nicht mehr möglich ist, d.h. dass die sogenannte Nierenschwelle überschritten wird und so die Plasma-Halbwertszeiten solcher Derivate erheblich im Vergleich zu den unkonjugierten Wirkstoffen verlängert werden. Darüber hinaus lassen sich durch die Kopplung mit Polyethylenglycol-Derivaten die Antigenität von z.B. Proteinen nicht menschlichen Ursprungs reduzieren, die

ansonsten zu immunologischen Nebenwirkungen bei der Applikation führen würden.

Polyethylenglycol (PEG) hat jedoch den Nachteil, dass es ein nicht metabolisierbares Molekül ist und mit diesem derivatisierte Proteine auch zur Vakuolisierung der Niere führen können. Daher ist es von besonderem Interesse, Derivatisierungen von Wirkstoffen mit metabolisierbaren Polymeren durchzuführen, deren Abbau im Körper vorzugsweise steuerbar ist. Ein geeignetes Molekül hierfür ist Hydroxyethylstärke (HES), welche als Plasmaexpander in verschiedenen molekularen Spezifikationen seit langem breit eingesetzt wird (DE 196 28 705 A1).

HES weist auch bei Applikation in sehr hohen Dosen nur sehr selten und in sehr geringem Umfang Nebenwirkungen auf, verglichen mit anderen Plasmaexpandern, wie z.B. Gelatine-Derivaten oder Dextranen, oder auch Humanalbumin.

Ein weithin ungelöstes Problem bei der Derivatisierung von Wirkstoffen ist jedoch die selektive Anbindung des Wirkstoffs an den Träger. Bei Proteinen ist es beispielsweise wünschenswert, die Kopplung an einen Träger in ausreichender Entfernung vom reaktiven Zentrum oder vom Rezeptor durchzuführen. Ansonsten kann die Aktivität herabgesetzt oder zerstört werden.

De 196 28 705 A1 beschreibt ein Verfahren zur Anbindung von Hämoglobin an Hydroxyethylstärke. Allerdings findet

die Anbindung relativ unselektiv über die zahlreichen freien Aminogruppen des Hämoglobins statt.

In Anbetracht des diskutierten Standes der Technik lag der Erfindung die Aufgabe zugrunde, Stärkederivate zur Verfügung zu stellen, die möglichst selektiv an einen Wirkstoff binden.

Ferner sollte ein solches Stärkederivat so beschaffen sein, dass eine möglichst quantitative Anbindung eines Wirkstoffes durch kovalente Bindung an dieses Stärkederivat stattfindet.

Der Erfindung lag weiterhin die Aufgabe zugrunde, Stärkederivate zur Verfügung zu stellen, deren Abbauverhalten im Organismus steuerbar ist. Insbesondere sollten die Stärkederivate derart beschaffen sein, dass sie die Nierenschwelle nicht passieren können und eine schnelle Ausscheidung verhindert wird. Im Ergebnis sollten die Stärkederivate eine verlängerte Halbwertszeit im Blutserum aufweisen. Dennoch sollten die Stärkederivate innerhalb einer physiologisch vernünftigen Zeit restlos abbaubar sein.

Ebenso sollte das Löslichkeitsverhalten von Wirkstoffen in wässriger Phase und in organischen Lösungsmitteln durch ihre Anbindung an die benannten Stärkederivate in einem weiten Bereich gesteuert werden können.

Schließlich lag der Erfindung die Aufgabe zugrunde ein möglichst einfaches und kostengünstiges Verfahren zur

Herstellung solcher Stärkederivate und ihrer Kopplungsprodukte mit Wirkstoffen zur Verfügung zu stellen.

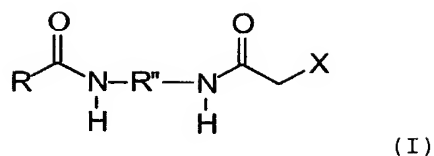
Gelöst werden diese Aufgaben sowie weitere, die zwar nicht wörtlich genannt werden, sich aber aus den hierin diskutierten Zusammenhängen wie selbstverständlich ableiten lassen oder sich aus diesen zwangsläufig ergeben, mit den in Anspruch 1 beschriebenen Stärkederivaten. Zweckmäßige Abwandlungen dieser erfindungsgemäßen Stärkederivate werden in den auf Anspruch 1 rückbezogenen Unteransprüchen 2-9 unter Schutz gestellt.

In den Ansprüchen 10-25 werden Konjugate solcher Stärkederivate mit Wirkstoffen unter Schutz gestellt.

Hinsichtlich eines Verfahrens zur Herstellung der Stärke-Wirkstoff-Konjugate, bei dem man die genannten Stärkederivate als Zwischenprodukt erhält, liefern die Ansprüche 26-28 eine Lösung der zugrunde liegenden Aufgabe.

Die Ansprüche 29-31 beschreiben Arzneimittel, welche die erfindungsgemäßen Stärke-Wirkstoff-Konjugate umfassen und bevorzugte medizinische Verwendungen dieser Arzneimittel.

Durch die Bereitstellung von Verbindungen der Formel (I)



wobei X ein Brom oder Iodatombedeutet, R'' eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Aryl- oder Aralkylgruppe bedeutet und R-CO- einen oxidierten substituierten oder unsubstituierten Stärkerest bedeutet, der an der reduzierenden Endgruppe zu einer Carbonsäure oxidiert ist, gelingt es Stärkederivate zur Verfügung zu stellen, die äußerst selektiv an die SH-Funktionen von Wirkstoffen binden.

Weiterhin werden durch die erfindungsgemäße Verbindung die folgenden Vorteile erzielt:

Durch die besondere Ausgestaltung der Stärkederivate wird verhindert, dass diese die Nierenschwelle passieren können, wodurch die Halbwertszeit des Wirkstoffs im Blutserum verlängert wird. Die Halbwertszeit beschreibt die Zeit, nach der die Hälfte des eingesetzten Wirkstoffs abgebaut oder ausgeschieden wurde.

Die Verbindungen der Formel (I) sind innerhalb einer physiologisch vernünftigen Zeit restlos abbaubar und weisen auf der anderen Seite dennoch ein steuerbares Eliminationsverhalten auf.

Derivate nach Anspruch 1 lassen sich generell von jeder Stärke herstellen, die eine zu einer Carbonsäure oxidierbare Gruppe aufweist. Vorzugsweise handelt es

sich dabei um die reduzierende Endgruppe einer Stärke. Es wurde gefunden, dass die zuvor genannten Eigenschaften der Verbindung (I) besonders gut erzielt werden können, wenn der oxidierte Stärkerest R-CO- ein Hydroxyethylstärkerest ist.

Ausgangsprodukte für die Gewinnung von Hydroxyethylstärke sind Stärken, die einen hohen Gehalt an Amylopektin, der hochverzweigten Komponente von Stärke, aufweisen, insbesondere Kartoffelstärke, Wachsmaisstärke, Sorghumstärke oder wachsartige Reisstärke.

Zur groben Voreinstellung des beabsichtigten Molekulargewichts werden diese Stärken einer hydrolytischen Abbaureaktion unterworfen. Dabei wird das Molekulargewicht von etwa 20.000.000 Dalton auf mehrere Millionen Dalton reduziert.

Bei der anschließenden alkalischen Hydroxyethylierung mit bekannten Hydroxyethylierungsmitteln ist die Einführung einer Hydroxyethylgruppe in Position 2, 3 und 6 der Anhydroglucoseeinheit möglich. Disubstituierte Einheiten, wie 2,3-Dihydroxyethyl-anhydroglucose, 2,6-Dihydroxyethyl-anhydroglucose werden dabei mit geringerer Wahrscheinlichkeit bei der Synthese gebildet.

Für die Erfassung der Substitution durch Hydroxyethylgruppen existieren zwei unterschiedlich definierte Substitutionsgrade.

Der Substitutionsgrad MS (molar substitution) ist definiert als die durchschnittliche Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Anhydroglucoseeinheit. Er wird ermittelt aus der Gesamtanzahl der Hydroxyethylgruppen in einer Probe, beispielsweise nach Morgan, durch Ätherspaltung und anschließender quantitativer Bestimmung von Ethyliodid und Ethylen, die hierbei gebildet werden.

Hingegen ist der Substitutionsgrad DS (degree of substitution) definiert als der Anteil der substituierten Anhydroglucoseeinheiten aller Anhydroglucoseeinheiten. Ihn kann man bestimmen aus der gemessenen Menge der unsubstituierten Glucose nach Hydrolyse einer Probe. Aus diesen Definitionen ergibt sich, daß $MS > DS$. Für den Fall, daß nur Monosubstitution vorliegt, also jede substituierte Anhydroglucoseeinheit nur eine Hydroxyethylgruppe trägt, ist $MS = DS$.

Ein Hydroxyethylstärkerest innerhalb der Formel (I) der vorliegenden Erfindung weist bevorzugt einen Substitutionsgrad MS von 0,1 bis 0,8 auf. Besonders bevorzugt weist der Hydroxyethylstärkerest einen Substitutionsgrad MS von 0,4 bis 0,7 auf.

Die Reaktivität der einzelnen Hydroxygruppen in der unsubstituierten Anhydroglucoseeinheit gegenüber Hydroxyethylierung ist je nach Reaktionsbedingungen unterschiedlich. Innerhalb gewisser Grenzen ist dadurch das Substitutionsmuster, also die einzelnen, unterschiedlich substituierten Anhydroglucosen, die statistisch auf die einzelnen Polymermoleküle verteilt sind, beeinflussbar. Vorteilhaft werden überwiegend die

C₂- und die C₆-Position hydroxyethyliert, wobei die C₆-Position aufgrund ihrer leichteren Zugänglichkeit häufiger substituiert wird.

Vorzugsweise verwendet werden im Rahmen dieser Erfindung überwiegend in C₂-Position substituierte Hydroxyethylstärken (HES), die möglichst homogen substituiert sind. Die Herstellung solcher HES wird in EP 0 402 724 B2 beschrieben. Sie sind innerhalb einer physiologisch vernünftigen Zeit restlos abbaubar und weisen auf der anderen Seite dennoch ein steuerbares Eliminationsverhalten auf. Die überwiegende C₂-Substitution macht die Hydroxyethylstärke relativ schwierig abbaubar für α -Amylase. Es ist von Vorteil, daß möglichst keine innerhalb der Polymermoleküle hintereinander substituieren Anhydroglucoseeinheiten auftreten, um die restlose Abbaubarkeit zu gewährleisten. Weiterhin besitzen solche Hydroxyethylstärken trotz der niedrigen Substitution eine ausreichend hohe Löslichkeit in wässrigem Medium, so daß die Lösungen auch über längere Zeiträume stabil sind und sich keine Agglomerate bzw. Gele bilden.

Bezogen auf die Hydroxyethylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten weist ein Hydroxyethylstärkerest innerhalb der Formel (I) der vorliegenden Erfindung bevorzugt ein Verhältnis von C₂:C₆-Substitution im Bereich von 2 bis 12 auf. Besonders bevorzugt beträgt das Verhältnis von C₂:C₆-Substitution 3 bis 11.

Zur Kopplung mit einem Wirkstoff werden Hydroxyethylstärken (HES) bevorzugt an ihrem reduzierenden Ende zur Carbonsäure bzw. zum Lacton

oxidiert. De 196 28 705 A1 beschreibt ein Verfahren, in dem HES mit Iod/Kaliumhydroxid am reduzierenden Ende oxidiert wird. Eine anschließende Kopplung an einen Wirkstoff kann über die erhaltene Säurefunktion erfolgen.

Der Rest R-CO- in der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (I) bezeichnet in der bevorzugten Ausgestaltung einen oxidierten Hydroxyethylstärkerest, der an der reduzierenden Endgruppe auf die beschriebene Art und Weise zu einer Carbonsäure oxidiert ist.

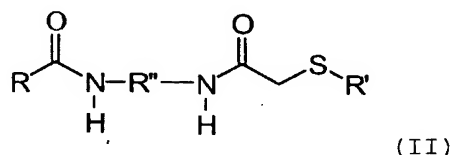
Bedingt durch den Einsatz des natürlichen Ausgangsrohstoffes Amylopektin sowie durch das Herstellungsverfahren, bei dem im gewissen Umfang eine Spaltung der Polymerketten notwendig ist, liegt Hydroxyethylstärke nicht als molekulareinheitliche Substanz mit definiertem Molekulargewicht vor, sondern als Gemisch von Molekülen unterschiedlicher Größe, die auch verschieden durch Hydroxyethylgruppen substituiert sind. Die Charakterisierung solcher Gemische bedarf der Zuhilfenahme statistisch gemittelter Größen (vgl. K. Sommermeyer et. al., "Klinisch verwendete Hydroxyethylstärke: Physikalisch-chemische Charakterisierung", Krankenhauspharmazie, 271 (1987)). Zur Kennzeichnung des durchschnittlichen Molekulargewichts dient daher das gemittelte Molekulargewicht M_w . Die allgemeine Definition dieses Mittelwerts lautet:

$$M_w = \frac{\sum_i N_i \cdot M_i^w}{\sum_i N_i \cdot M_i^{w-1}}$$

Ein Hydroxyethylstärkerest R-CO- innerhalb der Formel (I) der vorliegenden Erfindung besitzt bevorzugt ein mittleres Molekulargewicht Mw von 2.000 bis 1.000.000 D (bestimmt mit Gelpermeationschromatographie). Noch mehr bevorzugt beträgt das mittlere Molekulargewicht Mw 5.000 bis 500.000 D und am meisten bevorzugt 8.000 bis 250.000 D.

Die Gruppe R" in der Verbindung (I) kann sowohl gesättigte als auch ungesättigte Bindungen enthalten. Ein Alkyl-, Arylrest oder Aralkylrest als R" kann ebenso weitere Substituenten enthalten, wie z.B. Alkyl-, Aryl-, Aralkyl-, Halogen-, Carbonyl-, Acyl-, Carboxyl-, Carboxylester-, Hydroxy, Thiol-, Alkoxy- und/oder Alkylthiosubstituenten. In einer bevorzugten Ausführungsform ist R" eine Gruppe der Formel $(CH_2)_n$, wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 10 bedeutet. Besonders bevorzugt ist R" eine Ethylen-, Propylen-, Butylen-, Pentamethylen-, Hexamethylen- oder Oktamethylengruppe.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Stärke-Wirkstoff-Konjugate der allgemeinen Formel (II)



wobei R" eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Aryl- oder Aralkylgruppe bedeutet, R-CO- einen oxidierten substituierten oder unsubstituierten Stärkerest bedeutet, der an der reduzierenden Endgruppe

zu einer Carbonsäure oxidiert ist, und R' der Rest eines Wirkstoffs ist.

Die Stärke-Wirkstoff-Konjugate der Formel (II) sind Kopplungsprodukte aus den zuvor beschriebenen Verbindungen der Formel (I) und einem Wirkstoff, welcher mindestens eine SH-Gruppe enthält. Die Reste R-CO- und R" haben die selben Bedeutungen wie bereits zuvor anhand der Formel (I) erläutert.

Bevorzugte Wirkstoffe R'-SH, die als Rest R'-S- in den Verbindungen der Formel (II) enthalten sind, sind ausgewählt aus einem Peptid, einem Protein, einem Antibiotikum, einer Nukleinsäure, oder einem Hormon. Voraussetzung ist, dass diese Verbindungen mindestens eine SH-Gruppe enthalten.

Es kann sich ebenso um ein Protein oder Petid handeln, dem ein Cysteinrest durch gezielte Mutagenese eingeführt wurde. Sofern in Proteinen oder Peptiden keine SH-Gruppen vorhanden sind, können im Rahmen der vorliegenden Erfindung sogenannte Cysteinmuteine von therapeutischen Proteinen verwendet werden, bei denen durch gentechnisch gezielte Mutagenese ein Austausch bzw. eine Einführung von Cysteinresten gezielt durchgeführt wurde. Ein solcher Austausch ist der Fachwelt bekannt und u.a. beschrieben in: A. Bendele et al., Short Communication: Renal Tubular Vacuolation in Animals Treated with Polyethylene-Glycol conjugated Proteins, Toxicological Sciences 42, 152-157 (1998).

Ebenso können SH-Funktionen in Wirkstoffe, die eine primäre Aminogruppe tragen, durch Umsetzung mit 2-Iminothiolan (Trauts-Reagenz) eingeführt werden, bevor

man die Wirkstoffe mit Verbindungen der Formel (I) umsetzt. Die Einführung von SH-Funktionen in Wirkstoffe, wie z.B. in Proteine, mittels dieser Methode ist der Fachwelt allgemein bekannt.

Bevorzugte Wirkstoff-Proteine sind therapeutische Antikörper, Antikörper-Fab-Fragmente oder Antikörper-F(ab')₂-Fragmente. Solche Antikörper Fragmente sind wegen ihres relativ kleinen Molekulargewichts leicht nierengängig und können durch die Derivatisierung mit Stärke in ihrer Serum-Halbwertszeit verlängert werden. Ebenso wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, dass der hydrolytische Abbau der Antikörper bzw. der Antikörperfragmente durch Proteasen mit Hilfe der Derivatisierung mit Hydroxyethylstärke verringert werden kann.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen handelt es sich bei dem Wirkstoff um ein Cytokin, insbesondere um ein Interferon α 2a oder ein Interferon α 2b, oder um Erythropoetin.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, dass die Löslichkeit eines Wirkstoffs im wässrigen Medium beeinflusst werden kann, wenn man diesen an eine Verbindung der Formel (I) koppelt und in ein Stärke-Wirkstoff-Konjugat der Formel (II) überführt.

Im Rahmen der Erfindung wurde ebenfalls festgestellt, dass die Löslichkeit eines Proteins oder Enzyms in organischen Lösungsmitteln erhöht werden kann, wenn man das Protein oder Enzym an eine Verbindung der Formel

(I) koppelt und in ein Stärke-Wirkstoff-Konjugat der Formel (II) überführt. Bevorzugte aprotische Lösungsmitteln sind Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Dimethylacetamid.

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ebenso ein Verfahren zur Herstellung der vorangehend beschriebenen Stärke-Wirkstoff-Konjugate der Formel (II). Als Zwischenprodukt dieses Verfahrens wird das eingangs beschriebene Stärkederivat der Formel (I) erhalten. Das Verfahren ist durch folgende Schritte gekennzeichnet:

a) Zunächst werden die reduzierenden Endgruppen einer substituierten oder unsubstituierten Stärke selektiv zur Carboxyl- oder Lactongruppe oxidiert. Bevorzugt wird Hydroxyethylstärke eingesetzt. Die Oxidation kann beispielsweise mit Iod/Kaliumhydroxid entsprechend DE 196 28 705 A1 erfolgen.

b) Die in Schritt a) erhaltene oxidierte Stärke oder Hydroxyethylstärke wird an ihrer Carboxylgruppe oder Lactongruppe mit einem Diamin

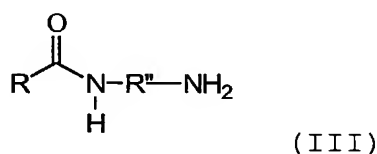


umgesetzt, wobei R'' einen Alkyl-, Aryl- oder Aralkylrest bedeutet, welcher verzweigt oder unverzweigt sein kann. Ebenso können die genannte Reste sowohl gesättigte als auch ungesättigte Bindungen enthalten. Ein Alkylrest, Arylrest oder Aralkylrest kann ebenso weitere Substituenten enthalten, wie z.B. Alkyl-, Aryl-, Aralkyl-, Halogen-, Carbonyl-, Acyl-,

Carboxyl-, Carboxylester-, Hydroxy, Thiol-, Alkoxy- und/oder Alkylthiosubstituenten.

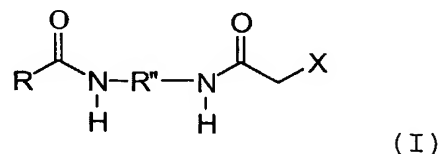
Vorzugsweise ist R" ein unverzweigter gesättigter Alkylrest (CH₂)_n, wobei n eine ganze Zahl von 2 bis 10 bedeutet. Besonders bevorzugte Verbindungen sind Ethylendiamin, 1,3-Diaminopropan, 1,4-Diaminobutan, 1,5-Diaminopentan, 1,6-Diaminohexan und 1,8-Diaminooktan.

Durch die Umsetzung der oxidierten substituierten oder unsubstituierten Stärke mit dem zuvor beschriebenen Diamin erhält man eine Verbindung der Formel (III)



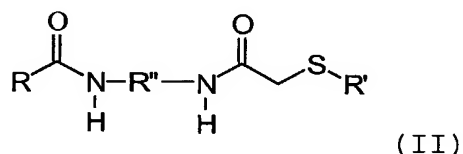
in der R-CO- einen, wie schon eingangs anhand der Formel (I) beschriebenen, oxidierten substituierten oder unsubstituierten Stärkerest darstellt, der an der reduzierenden Endgruppe zu einer Carbonsäure oxidiert ist.

c) Die Verbindung der Formel (III) wird mit einer Halogenessigsäure und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid als Aktivator zu einer Verbindung der Formel (I) umgesetzt



bei der X ein Brom oder Iodatombedeutet.

d) Schließlich wird die Verbindung der Formel (I) mit einem Wirkstoff mit mindestens einem Thiolrest R'-SH zu einem Stärke-Wirkstoff-Konjugat der allgemeinen Formel (II) umgesetzt.



wobei R' einen Wirkstoffrest darstellt.

Es wurde gefunden, dass unter neutralen bis leicht alkalischen Bedingungen die Thiolgruppe eines Wirkstoffs schneller als andere reaktive Gruppen mit Verbindungen der Formel (I) reagiert. Vorzugsweise beträgt der pH-Wert 6,5-8,5. Unter diesen Bedingungen findet eine Deprotonierung der Thiolgruppe zum Thiolation statt, welches besonders reaktiv ist und selektiv mit Verbindungen der Formel (I) reagiert.

Es wurde festgestellt, dass mit dem voranstehend beschriebenen Verfahren die Derivatisierung eines Wirkstoffs durch Kopplung an eine Stärke äußerst selektiv durchgeführt werden kann. Selektiv bedeutet in diesem Fall, dass ein Wirkstoff im wesentlichen nur über seine Thiolgruppen mit Verbindungen der Formel (I) reagiert und dass die Kopplung zum Stärke-Wirkstoff-Konjugat im wesentlichen nur über Thioetherbindungen stattfindet.

Besonders bevorzugt wird das Kopplungsverfahren mit SH-Gruppen enthaltenden Peptiden oder Proteinen durchgeführt. Dabei ist eine Reaktion der Verbindung (I) auch mit SS-Gruppen eines Proteins oder Peptids möglich, nachdem diese in SH-Gruppen überführt wurden.

Die Ausbeuten der Umsetzung von Verbindungen der Formel (I) mit einem SH-Gruppen enthaltenden Peptid oder Protein betragen je nach Molekulargewicht des Proteins oder Peptids und der Anzahl der SH- oder SS-Gruppen zwischen 20% und 90%. Im günstigen Fall ist demzufolge eine weitgehend quantitative Kopplung eines Wirkstoffs an den Stärketräger erreichbar.

Es ist ebenso möglich, ein Zwischenprodukt der Formel (III) in Schritt c) des oben beschriebenen Verfahrens statt mit einer Halogenessigsäure mit anderen gebräuchlichen Vernetzungsmitteln umzusetzen. In diesem Fall reagiert eine funktionelle Gruppe des Vernetzungsmittels mit der primären Aminogruppe der Verbindung (III). Im folgenden Schritt reagiert eine der übrigen funktionellen Gruppen des Vernetzungsmittels mit einer funktionellen Gruppe eines Wirkstoffes, vorzugsweise mit einer SH-Gruppe, wodurch ein Stärke-Wirkstoff-Konjugat gebildet wird. Gebräuchliche Vernetzungsmittel sind z.B. bifunktionelle Vernetzungsmittel mit α - ω -endständigen gleichartigen oder verschiedenen funktionellen Gruppen. Eine Übersicht über solche Vernetzungsmittel ist im Katalog der Firma Perbio (2001/2002) zu finden.

Weiterhin ist es möglich und für den Fachmann selbstverständlich, einen eingangs beschriebenen Stärkerest oder Hydroxyethylstärkerest, der an der reduzierenden Endgruppe zu einer Carbonsäure oxidiert ist, direkt mit einem der oben beschriebenen gebräuchlichen Vernetzungsmittel umzusetzen. In diesem Fall reagiert eine funktionelle Gruppe des Vernetzungsmittels mit der Carboxylgruppe der oxidierten Stärke bzw. Hydroxyethylstärke. Im folgenden Schritt reagiert eine der übrigen funktionellen Gruppen des Vernetzungsmittels mit einer funktionellen Gruppe eines Wirkstoffes, vorzugsweise mit einer SH-Gruppe, wodurch ein Stärke-Wirkstoff-Konjugat gebildet wird.

Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden die zuvor beschriebenen Stärkederivate von Wirkstoffen zur Herstellung eines Arzneimittels verwendet. Vorzugsweise handelt es sich dabei um ein Arzneimittel zur Behandlung von Infektionskrankheiten oder hormoneller Störungen. In diesem Zusammenhang kann ein solches Arzneimittel übliche pharmazeutische Hilfsstoffe enthalten.

Nachfolgend wird die Erfindung durch ein Beispiel beschrieben, ohne dass die Erfindung auf dieses beschränkt werden soll.

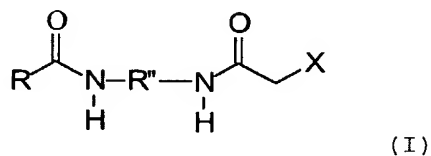
Beispiel 1:

10 g analog DE 196 28 705 A1 hergestelltes Konjugat aus oxidierten Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewichtes Mw von 40.000 und einem

Substitutionsgrad MS von 0,2 wurden zusammen mit Ethylendiamin in 50 ml destilliertem Wasser gelöst. 0,2 g Bromessigsäure wurden in 5 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 0,01 normaler Natronlauge auf 4,5 eingestellt und diese Lösung zu der oben beschriebenen aminofunktionalisierten Hydroxyethylärke gegeben. Während des Rührens wurden 0,1 g 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid zur Reaktionsmischung gegeben, und der pH-Wert für eine Stunde durch Zugabe von 0,01 normaler Salzsäure und anschließend 0,01 normaler Natronlauge bei 4,5 gehalten. Nach weiteren 2 Stunden Reaktionszeit wurde das Reaktionsprodukt ultrafiltriert und danach mit Ethanol gefällt und gewaschen und unter Lichtschutz im Vakuum getrocknet.

Patentansprüche

1. Stärkederivate der Formel (I)



wobei X ein Brom oder Iodatombedeutet, R'' eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Aryl- oder Aralkylgruppe bedeutet und R-CO- einen oxidierten substituierten oder unsubstituierten Stärkerest bedeutet, der an der reduzierenden Endgruppe zu einer Carbonsäure oxidiert ist.

2. Stärkederivate nach Anspruch 1, wobei R'' eine Gruppe der Formel $(\text{CH}_2)_n$ ist und n eine ganze Zahl von 1 bis 10 bedeutet.

3. Stärkederivate nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Molekulargewicht Mw von 2.000 bis 1.000.000 D aufweist.

4. Stärkederivate nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Molekulargewicht Mw von 5.000 bis 500.000 D aufweist.

5. Stärkederivate nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Molekulargewicht Mw von 8.000 bis 250.000 D aufweist.

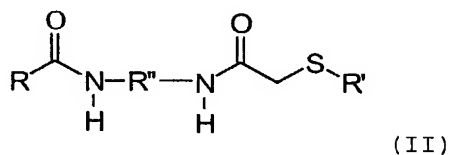
6. Stärkederivate nach Anspruch 1-5, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der einen Substitutionsgrad MS von 0,1 bis 0,8 aufweist.

7. Stärkederivate nach Anspruch 1-5, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der einen Substitutionsgrad MS von 0,4 bis 0,7 aufweist.

8. Stärkederivate nach Anspruch 1-7, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Verhältnis von C₂:C₆ Substitution im Bereich von 2-12, bezogen auf die Hydroxyethylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten, aufweist.

9. Stärkederivate nach Anspruch 1-7, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Verhältnis von C₂:C₆ Substitution im Bereich von 3-11, bezogen auf die Hydroxyethylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten, aufweist.

10. Stärke-Wirkstoff-Konjugate der Formel (II)



wobei R'' eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Aryl- oder Aralkylgruppe bedeutet, R-CO- einen

oxidierten substituierten oder unsubstituierten Stärkerest bedeutet, der an der reduzierenden Endgruppe zu einer Carbonsäure oxidiert ist, und R' der Rest eines Wirkstoffs ist.

11. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10, wobei R" eine Gruppe der Formel $(CH_2)_n$ ist und n eine ganze Zahl von 1 bis 10 bedeutet.

12. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10 oder 11, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidiertes Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Molekulargewicht Mw von 2.000 bis 1.000.000 D aufweist.

13. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10 oder 11, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidiertes Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Molekulargewicht Mw von 5.000 bis 500.000 D aufweist.

14. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10 oder 11, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidiertes Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Molekulargewicht Mw von 8.000 bis 250.000 D aufweist.

15. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10-14, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidiertes Hydroxyethylstärkerest ist, der einen Substitutionsgrad MS von 0,1 bis 0,8 aufweist.

16. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10-14, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidiertes Hydroxyethylstärkerest ist, der einen Substitutionsgrad MS von 0,4 bis 0,7 aufweist.

17. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10-16, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Verhältnis von C₂:C₆ Substitution im Bereich von 2-12, bezogen auf die Hydroxyethylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten, aufweist.

18. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10-16, wobei der Rest R-CO- ein zur Carbonsäure oxidierter Hydroxyethylstärkerest ist, der ein Verhältnis von C₂:C₆ Substitution im Bereich von 3-11, bezogen auf die Hydroxyethylgruppen der Anhydroglucoseeinheiten, aufweist.

19. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 10-18, wobei der Wirkstoff ausgewählt ist aus einem Peptid, einem Protein, einem Antibiotikum, einer Nukleinsäure oder einem Hormon.

20. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 19, wobei es sich bei dem Protein um einen Antikörper, ein Antikörper-Fab-Fragment oder ein Antikörper-F(ab')₂-Fragment handelt.

21. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 19, wobei es sich bei dem Protein um Erythropoetin handelt.

22. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 19, wobei es sich bei dem Protein um ein Peptid oder Protein handelt, dem durch gezielte Mutagenese ein Cysteinrest eingefügt wurde.

23. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 19, wobei es sich um einen Wirkstoff handelt, dem durch Umsetzung mit 2-Iminothioloan eine SH-Funktion eingefügt wurde.

24. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 19, wobei es sich bei dem Wirkstoff um ein Cytokin handelt.

25. Stärke-Wirkstoff-Konjugate nach Anspruch 24, wobei das Cytokin ausgewählt ist aus Interferon α 2a und Interferon α 2b.

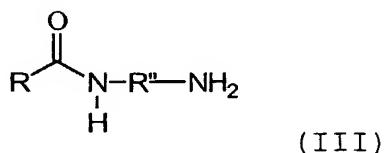
26. Verfahren zur Herstellung von Stärke-Wirkstoff-Konjugaten, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) die reduzierenden Endgruppen einer substituierten oder unsubstituierten Stärke zur Carboxyl- oder Lactongruppe oxidiert,

b) die in Schritt a) hergestellte Carboxylgruppe bzw. das Lacton mit einem Diamin

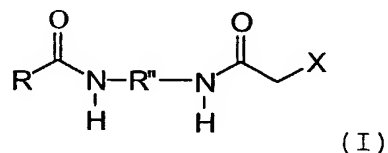


wobei R'' eine geradkettige oder verzweigte Alkyl-, Aryl- oder Aralkylgruppe bedeutet, zu einer Verbindung der Formel (III) umsetzt



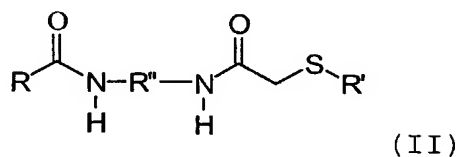
wobei R-CO- einen oxidierten substituierten oder unsubstituierten Stärkerest bedeutet, der an der reduzierenden Endgruppe zu einer Carbonsäure oxidiert ist,

c) die Verbindung der Formel (III) mit einer Halogenessigsäure und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid als Aktivator zu einer Verbindung der Formel (I) umsetzt



wobei X ein Brom oder Iodatombedeutet, und

d) die Verbindung der Formel (I) mit einem mindestens eine SH-Gruppe enthaltenden Wirkstoff R'SH zu einem Stärke-Wirkstoff-Konjugat der allgemeinen Formel (II) umsetzt.



wobei R' einen Wirkstoffrest darstellt.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass R'' eine Gruppe der Formel (CH₂)_n ist, wobei n eine ganze Zahl von 1 bis 10 bedeutet.

28. Verfahren nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung des Schrittes d) bei einem pH-Wert zwischen 6,5 und 8,5 durchgeführt wird.

29. Arzneimittel, umfassend ein Stärke-Wirkstoff-Konjugat gemäß den Ansprüchen 10-25.

30. Verwendung von Stärke-Wirkstoff-Konjugaten gemäß den Ansprüchen 10-25 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Infektionskrankheiten.

31. Verwendung von Stärke-Wirkstoff-Konjugaten gemäß den Ansprüchen 10-25 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung hormoneller Störungen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/01716

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C08B31/00 A61K31/718 A61K47/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	DE 101 35 694 A (SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS G) 6 February 2003 (2003-02-06) examples 3,4 ----	
A	FR 2 600 897 A (PF MEDICAMENT) 8 January 1988 (1988-01-08) claims 1-3,6 ----	
A	DE 196 28 705 A (FRESENIUS AG) 15 January 1998 (1998-01-15) cited in the application claim 1; examples A,B1,B2,C -----	

☐

Further documents are listed in the continuation of box C.

☒

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 June 2003

Date of mailing of the international search report

18/06/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Radke, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/01716

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10135694	A	06-02-2003	DE 10135694 A1	06-02-2003
FR 2600897	A	08-01-1988	FR 2600897 A1	08-01-1988
DE 19628705	A	15-01-1998	DE 19628705 A1	15-01-1998
			AT 209931 T	15-12-2001
			AU 710879 B2	30-09-1999
			AU 3541197 A	02-02-1998
			BR 9710865 A	11-01-2000
			CA 2258947 A1	15-01-1998
			DE 59705678 D1	17-01-2002
			DK 912197 T3	18-03-2002
			WO 9801158 A2	15-01-1998
			EP 0912197 A2	06-05-1999
			ES 2166551 T3	16-04-2002
			JP 2000514434 T	31-10-2000
			PT 912197 T	31-05-2002
			US 6083909 A	04-07-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/01716

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C08B31/00 A61K31/718 A61K47/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08B A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	DE 101 35 694 A (SUPRAMOL PARENTERAL COLLOIDS G) 6. Februar 2003 (2003-02-06) Beispiele 3,4	
A	FR 2 600 897 A (PF MEDICAMENT) 8. Januar 1988 (1988-01-08) Ansprüche 1-3,6	
A	DE 196 28 705 A (FRESENIUS AG) 15. Januar 1998 (1998-01-15) in der Anmeldung erwähnt Anspruch 1; Beispiele A,B1,B2,C	

☐

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Juni 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/06/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Radke, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Information des Aktenzeichens

PCT/EP 03/01716

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 10135694	A	06-02-2003	DE	10135694 A1	06-02-2003
FR 2600897	A	08-01-1988	FR	2600897 A1	08-01-1988
DE 19628705	A	15-01-1998	DE	19628705 A1	15-01-1998
			AT	209931 T	15-12-2001
			AU	710879 B2	30-09-1999
			AU	3541197 A	02-02-1998
			BR	9710865 A	11-01-2000
			CA	2258947 A1	15-01-1998
			DE	59705678 D1	17-01-2002
			DK	912197 T3	18-03-2002
			WO	9801158 A2	15-01-1998
			EP	0912197 A2	06-05-1999
			ES	2166551 T3	16-04-2002
			JP	2000514434 T	31-10-2000
			PT	912197 T	31-05-2002
			US	6083909 A	04-07-2000